



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

PCT/EP 03 / 1 2 4 7 6 #2

10/534392

REC'D 23 DEC 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02025008.0

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung Nr:  
Application no.: 02025008.0  
Demande no:

Anmeldetag: . . . . .  
Date of filing: 08.11.02 .  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten  
Lebensmitteln

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C12N15/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

08. Nov. 2002

## **Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln.

10 Kürzlich wurden von der schwedischen Lebensmittelbehörde (Swedish National Food Administration, NFA) und von Wissenschaftlern der Universität Stockholm neue Forschungsergebnisse veröffentlicht, wonach in verschiedenen Lebensmitteln, die beim Zubereiten hoch erhitzt werden, Acrylamid, eine giftige und möglicherweise krebserregende Substanz, gebildet wird. Die NFA informierte andere nationale und  
15 internationale Behörden und Organisationen, um eine internationale Zusammenarbeit und Forschung anzuregen, da es sich bei der Acrylamid-Bildung beim Erhitzen von Lebensmitteln wahrscheinlich um ein weit verbreitetes Phänomen handelt. Daraufhin fand im Sommer 2002 in Genf eine gemeinsam von der Welt- Ernährungsorganisation (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) und der Welt-  
20 Gesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) einberufene Expertenberatung zur gesundheitlichen Bedeutung des Vorkommens von Acrylamid in Lebensmitteln statt (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Geneva, 25-27 June 2002).

25 Die Expertenberatung diskutierte als wesentliche Endpunkte der toxikologischen Wirkungen von Acrylamid Neurotoxizität, Reproduktionstoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität.

Insbesondere ging die Expertenberatung davon aus, dass das genotoxische Potential  
30 von Acrylamid und seinem Stoffwechselprodukt Glycidamid eine wichtige Rolle spielt. Acrylamid ist in vivo genotoxisch in Körperzellen und in Keimzellen. Es kann daher vererbare Schäden auf der Ebene der Gene wie der Chromosomen bewirken. Bekanntermaßen ist eines seiner Stoffwechselprodukte das Glycidamid, ein chemisch reaktionsfähiges Epoxid, das direkt mit der DNA reagieren und Addukte bilden kann. Es

wurde hervorgehoben, dass genotoxische Mechanismen die wesentliche Rolle bei der Kanzerogenität von Acrylamid spielen.

Die Expertenberatung bewertete die vorliegenden Daten aus Studien mit Labortieren.

- 5 Sie hob dabei besonders die Bedeutung genotoxischer Mechanismen der Kanzerogenese hervor und war der Auffassung, dass zusätzliche alternative Mechanismen, z.B. hormonaler Natur, bisher kaum belegt seien.

- Die internationale Expertenkonsultation beschreibt die kanzerogene Potenz von Acrylamid in Ratten als vergleichbar zu der anderer in bestimmten Lebensmitteln z.T. in
- 10 Abhängigkeit von der Zubereitung vorkommenden Kanzerogenen, z.B. Benzpyren. Acrylamid komme allerdings in höheren Gehalten vor als alle bisher in Lebensmitteln gefundenen Kanzerogene. Für Menschen ist die relative Potenz von krebserregenden Stoffen in Lebensmitteln nicht bekannt. Die Daten aus epidemiologischen Studien bei beruflich exponierten Arbeitern sind wenig bedeutsam, da sie alle nicht geeignet sind,
- 15 kleine Veränderungen im Krebsrisiko zu erfassen. Insgesamt beurteilte die Expertenkonsultation die Gegenwart von Acrylamid in Lebensmitteln als besorgniserregend.

- Auf der verfügbaren Datenbasis kam die Expertenkonsultation der WHO/FAO zu dem
- 20 Ergebnis, dass Lebensmittel einen bedeutenden Beitrag zur Verbraucherexposition leisten.

- Acrylamid bildet sich, wenn bestimmte Lebensmittel bei höheren Temperaturen zubereitet werden. Neben der hohen Temperatur spielt die Zeitdauer der Einwirkung
- 25 hoher Temperaturen eine Rolle. Die internationale Expertenanhörung konnte keine weiteren gesicherten Hinweise auf den Bildungsmechanismus erkennen. Die Bildungsmechanismen von Acrylamid werden laut der Expertenberatung nach wie vor nicht verstanden.

- 30 Unter bestimmten Versuchsbedingungen scheint sich Acrylamid in vitro zu bilden bei der Reaktion von Aminosäuren, insbesondere von Asparagin (Mottram et al., Nature 419, (2002), 448; Stadler et al., Nature 419, (2002), 449) mit Zuckern, wie z.B. Fruktose, Galaktose, Laktose oder Saccharose (Stadler et al., Nature 419, (2002), 449).

Die Ursachen der Variabilität der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind bisher jedoch nicht ausreichend verstanden (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Genf, 25.-27. Juni 2002)).

- 5 Die von der FAO und der WHO einberufene internationale Expertenkonsultation empfahl die Erforschung der Beziehung zwischen Verarbeitungsbedingungen der Lebensmittel und der Bildung von Acrylamid sowie die Optimierung der Verarbeitungsbedingungen mit dem Ziel der Minimierung der Acrylamidgehalte.
- 10 Verfahren zur Minimierung der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind im Stand der Technik bisher nicht beschrieben und werden dringend benötigt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln erlauben, die im  
15 Vergleich zu herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Gehalt an Acrylamid aufweisen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln umfassend

- 25 a) die Bereitstellung von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist;
- b) die Verarbeitung besagten pflanzlichen Materials zu einem Lebensmittel; und
- 30 c) die Wärmebehandlung des in Verfahrensschritt b) erzeugten Lebensmittels.

Acrylamid (CAS-Nummer 79-06-1), das auch als 2-Propenamid, Vinylamid oder Ethylencarboxamid bezeichnet wird, ist ein bei Raumtemperatur farbloser Feststoff, der  
35 sehr gut in Wasser löslich, jedoch unlöslich in Heptan ist.

Unter dem Begriff „Verringerung des Acrylamidgehaltes“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Verringerung des Gehaltes an Acrylamid um mindestens 15%, insbesondere um mindestens 30%, vorzugsweise um mindestens 50%, 75% und besonders bevorzugt um mindestens 90% im Vergleich zum Acrylamidgehalt von entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln verstanden werden.

Verfahren zur Bestimmung des Acrylamidgehaltes von Lebensmitteln wurden beispielweise beschrieben in Tareke et al. (J. Agric. Food Chem. 50, (2002), 4998-5006).

10

Unter dem Begriff „Lebensmittel“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Lebensmittel verstanden werden, das pflanzliches Material enthält. Der Begriff umfasst insbesondere Vorstufen, wie z.B. Teigmischungen, Kartoffelscheiben, Granulate und Maiskörner, die zur Erzeugung „wärmebehandelter Lebensmittel“ geeignet sind.

15

Unter dem Begriff „wärmebehandeltes Lebensmittel“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Lebensmittel verstanden werden, das Temperaturen von > 100 °C, insbesondere von 120°C – 200°C, ausgesetzt wurde. Unter dem Begriff der „Wärmebehandlung“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede Behandlung, die zu Temperaturen von mehr als 100°C führt, insbesondere versteht man hierunter das Frittieren, Grillen, Braten, Rösten, Extrudieren, Backen oder die Mikrowellenerhitzung.

20

Beispiele für solche „wärmebehandelten Lebensmittel“ sind Kartoffelchips, Pommes Frites, Kartoffelpuffer, Kekse, Kracker, Knäckebrötchen, Frühstückscerealien, Maischips (Tacos), Pop Corn, Brotchips, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen, Kuchen, Reischips und Toastbrot, ferner Tortillas, Kroketten, Wedges, Kartoffelsticks, Twister, Panaden für Fleisch, Fisch und Gemüse, Panaden für Nüsse.

25

Unter dem Begriff „pflanzliches Material“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Material verstanden werden, das aus Pflanzen besteht oder das Teile von Pflanzen umfasst. Vorzugsweise handelt es bei besagten Teilen von Pflanzen um Ernteprodukte von Pflanzen, wie z.B. Knollen, Früchte, Samen, Zwiebeln und Wurzeln. Das pflanzliche Material kann aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, d.h.

30

35

sowohl aus monokotyledonen als auch aus dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um pflanzliches Material aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Besonders bevorzugt ist pflanzliches Material aus stärke-speichernden Pflanzen (z.B. Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbse, Maniok), insbesondere aus Kartoffelpflanzen.

Unter dem Begriff „löslicher Zucker“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jeder in pflanzlichem Material vorkommende, wasserlösliche Zucker verstanden werden, vorzugsweise handelt es sich bei den löslichen Zuckern um Hexosen, insbesondere um Fruktose und/oder Glukose.

Unter dem Begriff „Aminosäure“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede in pflanzlichem Material vorkommende Aminosäure verstanden werden, vorzugsweise handelt es sich hierbei um Asparagin.

Die Ursachen der Variabilität der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind bisher nicht ausreichend verstanden (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Geneva, 25-27 June 2002), so dass bisher keine Verfahren zur Minimierung der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln beschrieben wurden.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass die Wahl des pflanzlichen Ausgangsmaterials, das zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln eingesetzt wird, einen entscheidenden Einfluss auf die Acrylamidgehalte solcher Lebensmittel hat. Die Erfindung lehrt erstmals, dass der Einsatz von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichem Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist, die Herstellung von Lebensmitteln erlaubt, die nach Wärmebehandlung einen verringerten Gehalt an Acrylamid aufweisen, als bei Verwendung pflanzlichen Materials mit herkömmlichen Gehalten an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren. Die vorliegende Erfindung lehrt daher zur Vermeidung der Bildung von Acrylamid in wärmebehandelten Lebensmitteln solches pflanzliches Material zu verwenden, das einen vergleichsweise geringen Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist.

Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Zuckern, insbesondere von Fruktose und Glukose, von pflanzlichem Material sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Müller-Röber et al. (Mol. Gen. Genet. 224, (1990), 136-146).

5 Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin, von pflanzlichem Material sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Cohen, Meys, Tarvin (1988), The pico-tag method: A Manual of advanced techniques for amino acid analysis, Millipore Corporation, Milford, Mass., USA).

10 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose und/oder Fruktose führt im Vergleich zu  
15 entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

Die „genetische Modifikation“ kann dabei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

20 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die genetische Modifikation durch Mutagenese eines oder mehrerer Gene hervorgerufen werden. Die Art der Mutation ist dafür unerheblich, solange sie zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen  
25 Material von Wildtyp-Pflanzen führt.

Unter dem Begriff „Mutagenese“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jegliche Art von Mutation verstanden werden, wie z.B. Deletionen, Punktmutationen (Nukleotidaustausche), Insertionen, Inversionen, Genkonversionen oder  
30 Chromosomentranslokationen.

Die Mutation kann dabei durch den Einsatz chemischer Agenzien oder energiereicher Strahlung (z.B. Röntgen-, Neutronen-, Gamma- UV-Strahlung) erzeugt werden. Agenzien, die zur Erzeugung chemisch induzierter Mutationen eingesetzt werden  
35 können und die durch Einwirkung der entsprechenden Mutagene dabei entstehenden



Mutationen sind z.B. beschrieben bei Ehrenberg und Husain, 1981, (Mutation Research 86; 1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Die Erzeugung von Reismutanten unter Verwendung von Gamma-Strahlen, Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS), N-methyl-N-Nitrohamstoff oder Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) ist z.B. beschrieben in Jauhar und Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), bei Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta und Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) und Satoh und Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). Die Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von  $\text{NaN}_3$  bzw. Maleic hydrazide (1,2-dihydropyridazine-3,6-dione) ist in Arora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69) beschrieben. Eine Übersicht zur Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von verschiedenen Arten energiereicher Strahlung und chemischer Agenzien ist in Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28) dargestellt. Svec et al. (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) beschreiben die Anwendung von N-ethyl-N-Nitrohamstoff zur Erzeugung von Mutanten in Triticale. Die Verwendung von MMS und Gamma Strahlung zur Erzeugung von Hirsemutanten ist in Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23) beschrieben. Die Herstellung von Mutanten in Pflanzenspezies, die sich hauptsächlich vegetativ vermehren, wurde z.B. für Kartoffeln, die eine veränderte Stärke produzieren (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221), und für Minze mit erhöhtem Ölertrag bzw. veränderter Ölqualität (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463) beschrieben.

Alle diese Methoden sind grundsätzlich geeignet, pflanzliches Material zur Verfügung zu stellen, das aufgrund einer genetischen Modifikation einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern aufweist im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen und das daher für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist.

Das Auffinden von Mutationen in den entsprechenden Genen kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden geschehen. Insbesondere können hierzu Analysen, basierend auf Hybridisierungen mit Sonden (Southern Blot), der Amplifikation mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR), der Sequenzierung betreffender genomischer Sequenzen und die Suche nach einzelnen Nukleotidaustauschen angewandt werden. Methoden, um Mutationen anhand von Hybridisierungsmustern zu identifizieren, ist z.B. die Suche nach Restriktionsfragment Längenunterschieden (Restriction Fragment

- Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Eine auf PCR basierende Methode ist z.B. die Analyse von amplifizierten Fragment Längenunterschieden (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Auch die Verwendung von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen amplifizierten Fragmenten (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) kann zur Identifizierung von Mutationen herangezogen werden (Konieczny und Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Methoden zur Ermittlung von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sind u.a. von Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) und Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207) beschrieben worden. Insbesondere sind Methoden geeignet, die es erlauben, viele Pflanzen innerhalb kurzer Zeit auf Mutationen in bestimmten Genen hin zu untersuchen. Eine solche Methode, das sogenannte TILLING (Targetting Induced Local Lesions IN Genomes), ist von McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442) beschrieben worden.
- Die Verwendung aller dieser Methoden ist grundsätzlich geeignet, um genetisch modifiziertes pflanzliches Material, das für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, zu identifizieren.

Ferner kann das im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung einsetzbare genetisch modifizierte pflanzliche Material mittels gentechnischer Methoden (antisense-, cosuppressions-Technologie, Ribozyme, in-vivo-Mutagenese, RNAi-Technologie etc.) erzeugt werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „R1-Protein“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Proteine, die beispielsweise in Lorberth et al. (Nature Biotech. 16, (1998),

473-477), Ritte et al., (PNAS 99, (2002), 7166-7171) sowie in den internationalen Patentanmeldungen WO98/27212, WO00/77229, WO00/28052 beschrieben worden sind und die die folgenden Charakteristika aufweisen. Wichtige Charakteristika von R1 Proteinen sind i) ihre Aminosäuresequenz (s. beispielsweise GenBank Acc. No. A61831, Y09533); ii) ihre Lokalisation in den Plastiden pflanzlicher Zellen; iii) ihre Fähigkeit zur Beeinflussung des Grades der Phosphorylierung der Stärke in Pflanzen. Beispielsweise führt die Inhibierung des R1-Gens codierend für ein R1-Protein aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer Verringerung des Phosphatgehaltes der aus den Kartoffelknollen isolierbaren Stärke. Darüberhinaus konnten Lorberth et al. zeigen, dass das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in der Lage ist, bakterielles Glykogen zu phosphorylieren, wenn man die korrespondierende R1 cDNA in *E. coli* exprimiert (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477).

Ritte et al. (Plant J. 21, (2000), 387-391) konnten zeigen, dass das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelpflanzen reversibel an Stärkekörner bindet, wobei die Stärke der Bindung an das Stärkekorn abhängt vom metabolischen Status der Pflanze. In stärkekorngebundener Form liegt das Protein in Kartoffelpflanzen vornehmlich bei Blättern vor, die im Dunklen gehalten wurden. Nach Beleuchtung der Blätter liegt das Protein dagegen hauptsächlich in der löslichen, nicht an das Stärkekorn gebundenen Form vor.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist von besonderer Bedeutung, dass die Inhibierung der Expression des R1-Gens aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen bzw. bei deren Knollen zu einer Verringerung des sogenannten „cold-induced-sweetenings“ (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477) führt, d.h. kaltgelagerte Kartoffelknollen weisen einen im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern auf, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Ferner weisen die Kartoffelknollen dieser transgenen Pflanzen mit verminderter R1-Genexpression auch bereits unmittelbar nach der Ernte oder nach Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern auf, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Durch die vorliegende Erfindung konnte erstmals gezeigt werden, dass die Frittierung (kaltgelagerter) Kartoffelknollen, die von Pflanzen mit verminderter R1-Genexpression

stammen (Lorberth et al.; Nature Biotech. 16, (1998), 473-477), zu einer deutlich verringerten Acrylamidbildung führt als bei Frittierung entsprechender nicht genetisch modifizierter Kartoffelknollen.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 10 Unter dem Begriff „Invertase-Protein“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase verstanden werden. Invertasen katalysieren die Spaltung von Saccharose in Glukose und Fruktose. Vorzugsweise handelt es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung um saure Invertasen, die auch als vakuoläre Invertasen bezeichnet werden und beispielsweise
- 15 bei Zrenner et al. (Planta 198, (1996), 246-252) beschrieben wurden.

Kartoffel-Pflanzen mit verminderter Invertase-Aktivität wurden beispielsweise beschrieben bei Zrenner et al. (Planta 198, (1996), 246-252) und bei Greiner et al. (Nature Biotechnology 17, (1999), 708-711).

20

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist von besonderer Bedeutung, dass die Verringerung der Invertase-Aktivität in transgenen Kartoffelpflanzen, insbesondere bei solchen die einen vakuolären Invertase-Inhibitor aus Tabak exprimieren (Greiner et al., Nature Biotechnology 17, (1999), 708-711), dazu führt, dass kaltgelagerte

25 Kartoffelknollen dieser transgenen Pflanzen einen im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern aufweisen, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die R1- oder Invertase-Proteine codieren, und/oder eine Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Protein in den

30 Zellen des pflanzlichen Materials und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der R1- oder Invertase-Proteine in den Zellen des pflanzlichen Materials.

Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an R1- oder Invertase-Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Proteinen, die eine verringerte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des R1-Proteins kann in Anlehnung an einen von Ritte et al. (PNAS 99, (2002), 7166-7171) beschriebenen enzymatischen Assay bestimmt werden.

Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des Invertase-Proteins kann nach der von Greiner et al. (Nature Biotechnology 17, (1999), 708) beschriebenen Methode bestimmt werden.

Eine Verringerung der enzymatischen Aktivität des R1- oder des Invertase-Proteins bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Aktivität im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 60% und bevorzugt um mindestens 70%.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" bzw. „fremder Nucleinsäuremoleküle“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in den Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- (d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;

(f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und

(g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

(a) DNA-Molekülen, die einen Invertase-Inhibitor codieren.

(b) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;

(c) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Invertase -Proteine codieren;

(d) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Invertase -Proteine codieren;

(e) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt;

(f) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;

(g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt; und

(h) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Invertase-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Invertase-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Invertase-Proteinen bewirkt.

5 Zur Inhibierung der Genexpression mittels antisense- oder cosuppressions-Technologie kann beispielsweise ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein R1- oder Invertase-Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den  
10 Zellen einen antisense-Effekt bzw. cosuppressions-Effekt zu bewirken. Geeignet sind im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense- bzw. cosuppressions-Inhibition sind besonders bevorzugt Sequenzen mit einer Länge über 500 bp.

15 Für antisense- oder cosuppressions-Ansätze geeignet ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die ein R1- oder Invertase-Protein codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien von mindestens 90%, insbesondere zwischen 95 und 100%  
20 ist zu bevorzugen.

Ferner ist zur Erzielung eines antisense- oder eines cosuppressions-Effektes auch die Verwendung von Introns, d.h. von nicht-codierenden Bereichen von Genen, die für ein R1- oder Invertase-Protein kodieren, denkbar.

25 Die Verwendung von Intron-Sequenzen zur Inhibierung der Genexpression von Genen, die für Proteine der Stärkebiosynthese codieren, wurde beispielsweise beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214.

30 Dem Fachmann ist bekannt, wie er einen antisense- und einen cosuppressions- Effekt erzielen kann. Das Verfahren der cosuppressions-Inhibierung wurde beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-



159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Auch die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0321201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen des pflanzlichen Materials auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; Internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., (1999), PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen R1- oder Invertase-Gens, weist jedoch im Vergleich hierzu eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer R1- oder Invertase-Proteine.

Ferner kann die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen auch durch die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des R1- oder Invertase-Gens, hervorgerufen werden.

Dies kann beispielsweise durch die Verwendung von chimären Konstrukten erreicht werden, die „inverted repeats“ des jeweiligen Zielgens oder Teile des Zielgens enthalten. Hierbei codieren die chimären Konstrukte für sense und antisense RNA

Moleküle des jeweiligen Zielgens. Sense und antisense RNA werden *in planta* gleichzeitig als ein RNA-Molekül synthetisiert, wobei sense und antisense RNA durch einen Spacer voneinander getrennt sein und ein doppelsträngiges RNA-Molekül bilden können.

- 5 Es könnte gezeigt werden, dass die Einführung von inverted-repeat-DNA-Konstrukten in das Genom von Pflanzen eine sehr effiziente Methode ist, um die zu den inverted-repeat-DNA-Konstrukten korrespondierenden Gene zu reprimieren (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6  
10 (2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; internationale Patentanmeldung WO99/53050 A1). Sense und antisense Sequenzen des Zielgens bzw. der Zielgene können auch getrennt voneinander mittels gleicher oder unterschiedlicher Promotoren exprimiert werden (Nap, J-P et al, 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology,  
15 Quebec, 18.-24. Juni, 2000; Poster S7-27, Vortrag Session S7).

Die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen des pflanzlichen Materials kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von R1- oder Invertase-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted  
20 repeats“ von DNA-Molekülen von R1- oder Invertase-Genen oder -cDNAs in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden DNA-Moleküle (R1- oder Invertase-Gene oder- cDNAs oder Fragmente dieser Gene oder cDNAs) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter DNA-Moleküle steuert.

25 Darüberhinaus ist bekannt, dass die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotor-DNA-Molekülen in Pflanzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieser Promotoren führen kann, die im folgenden als Zielpromotoren bezeichnet werden sollen (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

30 Über die Inaktivierung des Zielpromotors ist es somit möglich, die Genexpression eines bestimmten Zielgens (z.B. R1- oder Invertase-Gen), das natürlicherweise unter der Kontrolle dieses Zielpromotors steht, zu verringern.

D.h., die DNA-Moleküle, die die Zielpromotoren der zu reprimierenden Gene (Zielgene) umfassen, werden in diesem Fall, im Gegensatz zur ursprünglichen Funktion von

Promotoren in Pflanzen, nicht als Steuerelemente zur Expression von Genen oder cDNAs, sondern selbst als transkribierbare DNA-Moleküle verwendet.

Zur Erzeugung der doppelsträngigen Zielpromotor-RNA-Moleküle *in planta*, die dort als RNA-Haarnadel-Moleküle (RNA hairpin) vorliegen können; werden vorzugsweise

5 Konstrukte verwendet, die „inverted repeats“ der Zielpromotor-DNA-Moleküle enthalten, wobei die Zielpromotor-DNA-Moleküle unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Genexpression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert. Anschließend werden

diese Konstrukte in das Genom von Pflanzen eingeführt. Die Expression der „inverted repeats“ besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle führt *in planta* zur Bildung  
10 doppelsträngiger Zielpromotor-RNA-Moleküle (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Hierdurch kann der Zielpromotor inaktiviert werden.

Die Verringerung der R1- oder Invertase -Aktivität in den Pflanzenzellen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von Promotorsequenzen von R1- oder Invertase-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted  
15 repeats“ von Promotor-DNA-Molekülen von R1- oder Invertase-Promotoren in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden Zielpromotor-DNA-Moleküle (R1- oder Invertase -Promotor) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem fremden Nucleinsäuremolekül um inserierte Transposons oder sogenannter transfer DNA (T-DNA) in ein Gen kodierend für ein R1- oder Invertase-Protein, wobei dadurch die Aktivität der besagten Proteine in der betreffenden Zelle des pflanzlichen Materials reduziert wird.

25 Grundsätzlich kann das für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete pflanzliche Material sowohl mit Hilfe homologer, als auch heterologer Transposons hergestellt werden, wobei unter Verwendung von homologen Transposons auch solche zu verstehen sind, die bereits natürlicherweise im Pflanzengenom vorhanden sind.

30 Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt. Die  
35 Möglichkeit, Mutanten zu identifizieren, bei welchen spezifische Gene durch

Transposoninsertionsmutagenese inaktiviert wurden, ist in einer Übersicht von Maes et al. (1999, Trends in Plant Science 4 (3), 90-96) dargestellt. Die Erzeugung von Reismutanten mit Hilfe endogener Transposons ist von Hirochika (2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122) beschrieben. Die Identifizierung von Maisgenen, mit Hilfe endogener Retrotransposons wird z.B. von Hanley et al. (2000, The Plant Journal 22 (4), 557-566) dargestellt. Die Möglichkeit Mutanten mit Hilfe von Retrotransposons herzustellen und Methoden, Mutanten zu identifizieren, sind von Kumar und Hirochika (2001, Trends in Plant Science 6 (3), 127-134) beschrieben. Die Aktivität von heterologen Transposons in unterschiedlichen Spezies, ist sowohl für dikotyledone als auch für monokotyledone Pflanzen beschrieben worden: z.B. für Reis (Greco et al., 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, Molecular and General Genetics 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, The Plant Journal 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, Plant Science 161, 211-219), Gerste (2000, Koprek et al., The Plant Journal 24 (2), 253-263) *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, Nature 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11, 1841-1852), Tomate (Belzile und Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) und Kartoffel (Frey et al., 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177; Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213, 285-290).

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Veränderung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen kodierte Protein führen. Insbesondere führt die Integration einer T-DNA in den kodierenden Bereich eines Proteins häufig dazu, dass das entsprechende Protein von der betreffenden Zelle gar nicht mehr oder nicht mehr in aktiver Form synthetisiert werden kann. Die Verwendung von T-DNA Insertionen zur Erzeugung von Mutanten ist z.B. für *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan und Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov und Sundaresan, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11, 157-161) und Reis (Jeon und An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570) beschrieben. Methoden zur Identifizierung von Mutanten, die

mit Hilfe der T-DNA Insertionsmutagenese erzeugt wurden, sind u.a. beschrieben von Young et al., (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant cell 11, 2263-2270), Thomeycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), und McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622).

5

Die T-DNA Mutagenese ist grundsätzlich zur Erzeugung des pflanzlichen Materials geeignet, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann.

10 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere an Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

15 Die „genetische Modifikation“ kann dabei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

20 Hinsichtlich der unterschiedlichen denkbaren Wege für die Erzeugung von genetischen Modifikationen, die zu einer Verringerung des Aminosäuregehaltes, insbesondere von Asparagin, führen gelten die allgemeinen oben im Zusammenhang mit den genetischen Modifikationen, die zu einer Verringerung des Gehaltes an Zuckern führen, gemachten Aussagen.

25

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-  
30 Pflanzen.

Unter einem „Asparagin-Synthetase-Protein“ soll im Zusammenhag mit der vorliegenden Erfindung ein Protein verstanden werden, dass die Umwandlung von Aspartat in Asparagin unter Umwandlung von ATP in AMP und Pyrophosphat sowie von  
35 Glutamin in Glutamat katalysiert. Sequenzinformationen für Asparagin-Synthetasen

(asn1) wurden beispielsweise beschrieben bei Lam et al. (Plant Physiol. 106(4), (1994), 1347-1357).

Pflanzen mit verminderter Asparagin-Synthetase-Aktivität weisen einen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen verringerten Gehalt an Asparagin auf (Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists in Madison, WI, USA, (1998), Molecular and transgenic studies of asparagine synthetase genes in *Arabidopsis thaliana* , Abstract Number 535)

- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- (d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Protein bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt; und
- (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase - Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Asparagin-Synthetase -Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt.

In diesem Zusammenhang gelten die bereits oben in anderem Zusammenhang getroffenen allgemeinen Aussagen zur Durchführung der gentechnischen Ansätze (antisense-, cosuppressions- und Ribozym-Technologie, in-vivo-Mutagenese, Transposons, T-DNA Insertion) für die genetische Modifizierung der Asparagin-Synthetase-Aktivität entsprechend.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Erhöhung der Aktivität eines ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter einem „ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Protein“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Protein verstanden, das die Umwandlung von Glukose-1-Phosphat und ATP in ADP-Glukose und Pyrophosphat katalysiert.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer in der Pflanzenzelle vorkommenden ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff des „fremden Nucleinsäuremoleküls“ hat hierbei die bereits oben definierte Bedeutung.

Vorzugsweise kodiert das fremde Nucleinsäuremolekül eine deregulierte ADP-Glukose Pyrophosphorylase, besonders bevorzugt ist die ADP-Glukose Pyrophosphorylase aus *E. coli*, die als glgC16 bezeichnet wird und die bei Expression in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer gesteigerten Stärkesyntheserate führt. Kaltgelagerte Kartoffelknollen dieser Pflanzen zeigen eine deutlich verringerte Akkumulation von Hexosen (Stark et al., Science 258, (1992), 287-292; Stark et al., Ann. NY Acad. Sci. 792, (1996), 26-37).

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegenden Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen pflanzlichen Materials, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann, zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln, welche im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Acrylamidgehalt aufweisen.

**Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:**



## Beispiel 1

### Herstellung von Kartoffelchips und Pommes Frites aus Kartoffelknollen

- 5 Zur Herstellung von Kartoffelchips und Pommes Frites wurden reife Kartoffelknollen von transgenen Kartoffelpflanzen, die eine verminderte Expression des R1-Gens (Lorberth et al., Nature Biotechnology 16, (1998), 473-477) sowie Kartoffelknollen von Kartoffelpflanzen, die eine verminderte R1-Genexpression und zusätzlich eine verminderte Branching Enzyme I-Genexpression aufweisen (WO97/11188) verwendet.
- 10 Die weitere Verarbeitung zu Chips bzw. Pommes Frites erfolgte sofort nach der Ernte als auch nach unterschiedlich langer Lagerung bei 4°C.

Die Knollen wurden mit der Hand geschält und anschließend in einer Schneidemaschine (Modell Chef200, Firma Saro Emmerich, Deutschland) für die

15 Herstellung von Chips in Scheiben bzw. mit einem Stanzer (Weisser, Deutschland) zu Pommes Frites geschnitten.

Frittiert wurden die Proben in einer Friteuse (Frita4, Franke, Frifri aro GmbH, Deutschland) unterschiedlich lange mit Pflanzenfett (Palmaja, Meylip mbH & Co.KG,

20 Deutschland) bei einer Temperatur von 180°C.

Die frittierten Produkte wurden anschließend zerkleinert und auf ihren Gehalt an Acrylamid hin untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels GC/MS oder LC/MS-MS nach Derivatisierung (Epa-Methode 8032a, U.S. Environmental Protection Agency). Dies

25 gewährleistet neben einer niedrigen Bestimmungsgrenze eine hohe Selektivität des Nachweises.

Es konnte bei allen frittierten Proben gezeigt werden, dass der Gehalt an Acrylamid in den transgenen Kartoffelknollen um mindestens 15% verringert war im Vergleich zum

30 Acrylamidgehalt der Knollen der entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten  
Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen  
wärmebehandelten Lebensmitteln umfassend:
  - (a) die Bereitstellung von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu  
entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material einen verringerten  
Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist;
  - (b) die Verarbeitung besagten pflanzlichen Materials zu einem Lebensmittel; und
  - (c) die Wärmebehandlung des in Verfahrensschritt b) erzeugten Lebensmittels.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin besagte Lebensmittel ausgewählt sind aus der  
Gruppe bestehend aus Kartoffelchips, Pommes Frites, Kartoffelpuffer, Keksen,  
Krackern, Knäckebrötchen, Frühstückscerealien, Maischips (Tacos), Pop Corn,  
Brötchen, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen, Kuchen, Reischips und  
Toastbrot.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das verwendete pflanzliche  
Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die  
genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern  
führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von  
Wildtyp-Pflanzen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, worin besagte genetische Modifikation zu einer  
Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle  
vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht  
genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
5. Verfahren nach Anspruch 3, worin besagte genetische Modifikation zu einer  
Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle  
vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht  
genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
6. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, worin besagte genetische Modifikation in der  
Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren  
Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder  
mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im  
Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von  
Wildtyp-Pflanzen.

7. Verfahren nach Anspruch 6 worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- a. DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren; welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- b. DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;
- c. DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- d. Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- e. DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- f. DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und
- g. T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

8. Verfahren nach Anspruch 3 oder 5, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- a. DNA-Molekülen, die einen Invertase-Inhibitor codieren.
- b. DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;
- c. DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Invertase-Proteine codieren;
- d. DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Invertase-Proteine codieren;
- e. Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase-Proteinen bewirkt;
- f. DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;
- g. DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt; und
- h. T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Invertase -Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Invertase -Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren

führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichem pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

14. Verfahren nach Anspruch 13 worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- a. DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- b. DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- c. DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- d. Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Protein bewirkt;

- e. DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- f. DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt; und
- g. T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt.

15. Verfahren nach Anspruch 3, worin besagte genetische Modifikation zu einer Erhöhung der Aktivität eines ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer in der Pflanzenzelle vorkommenden ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

17. Verwendung von pflanzlichem Material gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln, welche im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Acrylamidgehalt aufweisen.

08. Nov. 2002

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes  
s von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen  
wärmebehandelten Lebensmitteln.

10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**